

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

## ⑫ 公開特許公報(A) 平3-161441

⑤ Int. Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	⑬ 公開 平成3年(1991)7月11日
A 61 K 31/47	ADP	7252-4C	
31/535	AEP	7252-4C	
// C 07 D 215/26		7019-4C	
215/48		7019-4C	
215/56		7019-4C	
265/38		7624-4C	
498/04			
		8615-4C	C 07 D 498/04 1 1 2 T
			審査請求 未請求 請求項の数 1 (全6頁)

⑭ 発明の名称 メイラード反応阻害剤

⑮ 特 願 平1-301413

⑯ 出 願 平1(1989)11月20日

⑰ 発 明 者 井 上 淳 大阪府摂津市正雀4丁目13番57号

⑱ 出 願 人 千寿製薬株式会社 大阪府大阪市中央区平野町2丁目5番8号

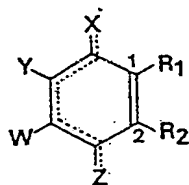
## 明 細 書

## 1. 発明の名称

メイラード反応阻害剤

## 2. 特許請求の範囲

(1) 一般式(1)



(1)

[式中、Xはヒドロキシル基、=O、=N-R<sub>3</sub>又は  
=N(-O)-R<sub>3</sub>を表わし、

YはXがヒドロキシル基又は=Oの場合には水素原子又はヒドロキシル基を表わし、その他の場合には-O-R<sub>4</sub>(ただし、-R<sub>3</sub>と-R<sub>4</sub>とはヒドロキシル基を有していてもよい同一の芳香6員環の隣接する2個の炭素原子上の各結合手を表わす。)を表わし、

Zは、Xがヒドロキシル基の場合にはヒドロキシ

ル基を表わし、その他の場合には=Oを表わし、  
Wは水素原子又はヒドロキシル基を表わし、  
-----は全体で3個の共役二重結合を表わすか又は  
環形成炭素原子間における2個の共役二重結合を表わし、

R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>は同一又は異なって水素原子、ヒドロキシル基を有していてもよい低級アルキル基又は低級アルケニル基、低級アルキル基又は低級アルケニル基を有していてもよいアミノ基又はイミノ基、又は低級アシル基を表わすか、あるいはR<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>は環形成炭素原子1及び2と共に含窒素5乃至6員環を形成し、該5乃至6員環は環形成炭素原子に低級アルキル基、トリフルオロメチル基、ヒドロキシル基、カルボキシル基又は低級アルコキシカルボニル基を有していてもよい。]で示される化合物又はその医薬として許容し得る塩を含有することを特徴とする、メイラード反応阻害剤。

## 3. 発明の詳細な説明

[産業上の利用分野]

本発明はメイラード反応として知られたブドウ

糖等によるタンパク質の劣化の防止に関し、詳しくはブドウ糖がタンパク質に非酵素的に結合して生ずるアマドリ転移生成物の生成阻害剤に関する。  
【従来の技術】

タンパク質がブドウ糖等の還元糖と非酵素的に反応（以下「グリコシル化」という。）して褐色化する反応はメイラードによって1912年に報告[Maillard, L.C., Compt. Rend. Soc. Biol., 72: 599(1912)]されて以来、食品化学の分野においてはメイラード反応の名で広く知られてきた。すなわち、貯蔵又は加熱処理を受けた食品中でタンパク質とブドウ糖とが反応して褐色化し、ついにはタンパク質分子間に交差結合が生じることによりタンパク質の変成が起こることが知られていた。その後、赤血球中においてヘモグロビンの小成分であるHb<sub>alc</sub>が糖尿病患者において増加しているとのラーバーの報告(Rahbar, S., Clin. Chim. Acta, 22: 296(1968))を機に、生体内におけるブドウ糖とタンパク質との反応が注目され、Hb<sub>alc</sub>の構造の解析を通じて、メイラード反応

化し蛍光を発するに至る。

メイラード反応は健常人においても認められる現象であるが、血糖上昇を特徴とする糖尿病に特に顕著に認められる。また、メイラード反応は代謝回転の比較的緩徐なタンパク質において顕著であり、例えばコラーゲンや水晶体の構造タンパク質であるクリスリン等において特に著しい。また、糖尿病においては神経障害、白内障、腎障害、網膜症、関節硬化症、アテローム性動脈硬化症等種々の合併症が認められるが、これら糖尿病合併症は老年期に多い疾病と酷似しており、正常な血糖値にあっても、ブドウ糖が代謝回転の緩徐なタンパク質をグリコシル化して徐々にAGEを形成するものと考えられている。

このような背景のもとで、生体内におけるメイラード反応を阻害する物質の探索が行なわれつつあり、例えば、前記ブラウニー等によりアミノグアニジンがインビトロ(in vitro)でメイラード反応を阻止すること及び同物質の投与が糖尿病ラットの動脈壁におけるAGEの生成を抑制する事

が生体内においても起こっていることが確認されるに至った。

生体中でのメイラード反応の機構はブラウニー等によって報告されている[Brownlee, M. et al., Science, 232:1629(1986)]。即ち、先ずブドウ糖の開環構造において存するアルデヒド基が蛋白質分子中のアミノ基と反応して Schiff 塩基を形成する。この Schiff 塩基は不安定であるため速やかに分子内転移反応を起こして非酵素的にアマドリ転移生成物に変換される。タンパク質が長期間体内に保持された場合、アマドリ転移生成物は徐々に脱水反応を起こして新たなブドウ糖誘導体へと変換し、これがタンパク質分子等の種々の分子と不可逆的に交差結合して架橋を形成することにより、主としてタンパク質の重合体を形成する。

このような進行したグリコシル化生成物は通常 AGE (Advanced Glycosilation End product) と略称されるが、AGEの生成に伴い、タンパク質の生物学的適応性が減弱し溶解度が低下し、プロテアーゼの作用を受け難くなり、多くは黄褐色

を発表している。また特開昭62-142114号明細書においてアミノグアニジン、 $\alpha$ -ヒドラジノヒスチジン及びリジンがアマドリ転移生成物中の活性カルボニル基と反応してこれを封鎖し、AGE生成を阻害することが示唆されており、特開昭64-56614号明細書において、例えばチオセミカルバジド類、1、3-ジアミノグアニジン、ベンゾイルヒドラジン等、及び特開昭64-83059号明細書において各種グアニジン誘導体がメイラード反応を抑制することが開示されている。

【発明が解決しようとする課題】

上記各特開昭明細書においては、メイラード反応の最終生成物であるAGEの生成量を指標としてメイラード反応の阻害剤の検討を行なっているが、本発明者はメイラード反応におけるタンパク質の重合の段階における直接的原因物質であるアマドリ転移生成物の生成自体を阻害することにより極めて効果的なメイラード反応の阻害が期待できるとの観点から、アマドリ転移生成物の生成阻

客を実験上の指標とした。タンパク質のリジン残基のε-アミノ基の非酵素的グリコシル化によって生成するアマドリ転移生成物である ε-N-(furfuryl-methyl)-L-lysine (以下「フロシン」という。)の測定値をタンパク質の非酵素的グリコシル化の指標となし得ることは、Bruggemann 等 [J. Bruggemann et al., Lebensm. Unters. Forsch., 137: p.137-143 (1968)] および Finot 等 [P. A. Finot et al., Experientia, 24: p.1097-1099 (1968)] によって報告されている。本発明者はブドウ糖含有タンパク質水溶液を用いてフロシンを生成させることを試み、適当な生成条件を求めて検討を重ね、それにより確立した条件に従って種々の物質のフロシン生成阻害効果の有無および強さについて検討した。その結果本発明者は、キノリンキノン類化合物に強力な効果を有するものがあることを発見し、更に検索を重ねて、各種の置換基を有するキノリンキノン類化合物及びその還元型化合物に同等のフロシン生成阻害効果があることを見いだすとともに、更にキノン又はキ

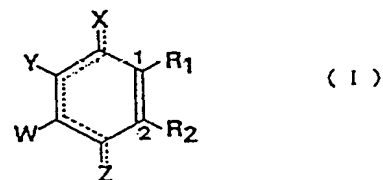
ル基を表わし、その他の場合には =O を表わし、W は 水素原子又はヒドロキシル基を表わし、  
 ----- は全体で 3 個の共役二重結合を表わすか又は環形成炭素原子間における 2 個の共役二重結合を表わし、

R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub> は同一又は異なって水素原子、ヒドロキシル基を有していてもよい低級アルキル基又は低級アルケニル基、低級アルキル基又は低級アルケニル基を有していてもよいアミノ基又はイミノ基、又は低級アシル基を表わすか、あるいは R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub> は環形成炭素原子 1 及び 2 と共に含窒素 5 乃至 6 員環を形成し、該 5 乃至 6 員環は環形成炭素原子に低級アルキル基、トリフルオロメチル基、ヒドロキシル基、カルボキシル基又は低級アルコキシルカルボニル基を有していてもよい。] で示される化合物又はその医薬として許容し得る塩を含有することを特徴とする、メイラード反応阻害剤である。ここに、低級アルキルとしては炭素数 1 乃至 5 のものが適当であり、該アルキル基は直鎖型、分岐型または環型を問わず用いられる。

ノリンキノン類から誘導し得るその他の化合物にも同様に強力な効果があることを発見して、メイラード反応阻害剤としての本発明を完成した。

【問題点を解決するための手段】

すなわち本発明は、一般式 (1)



【式中、Xは ヒドロキシル基、=O、=N-R<sub>3</sub> 又は =N(→O)-R<sub>3</sub>を表わし、

Yは Xがヒドロキシル基又は =O の場合には水素原子又はヒドロキシル基を表わし、その他の場合には -O-R<sub>4</sub> (ただし、-R<sub>3</sub> と -R<sub>4</sub> とはヒドロキシル基を有していてもよい同一の芳香 6 員環の隣接する 2 個の炭素原子上の各結合手を表わす。) を表わし、

Zは、Xが ヒドロキシル基の場合にはヒドロキシ

一般式 (1) で示される化合物としては、例えば後記表 1 に示す各化合物が特に好ましいものとして挙げられる。一般式 (1) で示される化合物の医薬として許容し得る塩としては、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ土類金属塩、塩酸塩、硫酸塩、リン酸塩等の無機酸の塩、又は酢酸、マレイン酸、等の有機酸の塩が特に適すが、これらのものに限定されず、通常、医薬として許容されている各種の塩が用いられる。

本発明のメイラード反応阻害剤はメイラード反応を原因として生ずると考えられる前述の諸疾患の治療又は予防に用いることができる。当該目的に供する場合、本発明のメイラード反応阻害剤は経口的に又は非経口的に投与することができる。また、非経口的投与の場合には注射剤として全身的に又は例えば点眼剤等として局所的に投与することもできる。本発明のメイラード反応阻害剤の投与量は、一般式 (1) で示される化合物として、経口投与の場合には通常、1 日量 1 mg ~ 100

0 mg の範囲、より好ましくは1日量5 mg ~ 200 mg の範囲で、注射の場合には通常、1日量0.1 mg ~ 100 mg の範囲、より好ましくは1日量1 mg ~ 50 mg の範囲で、また点眼液剤の場合には通常、0.05 w/v % ~ 5 w/v % の範囲、より好ましくは0.1 w/v % ~ 2.0 w/v % の範囲の液として、投与が行なわれるが、投与量はこれに必ずしも限定されるものではなく、疾患の種類、重症度及び治療計画等により適宜設定され得る。

本発明のメイラード反応阻害剤は、経口投与のための例えば錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤若しくはカプセル剤等、注射のための例えば水性若しくは非水性の注射用溶液剤、注射用懸濁剤若しくは注射用乳濁剤等、又は点眼のための例えば点眼液剤、もしくは点眼軟膏剤等の適宜の形態にすることができる。

本発明のメイラード反応阻害剤を経口投与用錠剤の形態とするには、例えばヒドロキシプロピルセルロース、結晶セルロース、コーンスターチ、

一般式(1)で示される化合物又はその医薬として許容し得る塩は、メイラード反応におけるタンパク質分子間架橋形成の直接の原因物質たるアマドリ転移生成物の生成自体を阻害するので、種々の糖尿病合併症、例えば冠動脈性心疾患、末梢循環障害、脳血管障害、神経症、腎症、動脈硬化、関節硬化症、白内障及び網膜症又は老化により引き起こされる同種の疾患例えばアテローム性動脈硬化症、冠動脈性心疾患、脳血管障害、老人性白内障等の治療又は予防に用いられる。

#### (実験例)

本発明のメイラード反応阻害剤の効果は下記の通りの実験により表1に記載した被験物質T-1 ~ T-11について確認した。各被験物質はいずれも既知物質であり、次の通りの方法にて入手した。

T-1: 特公昭35-2269号の記載に従って4, 5, 6, 8-テトラヒドロキシキノリン-2-カルボン酸を得、アルカリ性水溶液中過酸化水素により酸化して得た。

ポリビニルピロリドン、メタ塩酸アルミニウム、マグネシウム等の希釈剤、ステアリン酸マグネシウム等の滑沢剤、纖維素グルコン酸カルシウム等の崩壊剤、グルタミン酸又はアスパラギン酸等の溶解補助剤その他錠剤の製造に通常使用される成分を加えることができる。本発明のメイラード反応阻害剤を水性注射剤とするには例えばリン酸塩等の緩衝剤、クロロブタノール等の保存剤、亜硫酸ナトリウム等の安定化剤、塩化ナトリウム等の等張化剤その他注射剤の製造に通常使用される成分を加えることができる。本発明のメイラード反応阻害剤を点眼剤の形態とするには、例えば、リン酸塩、ほう酸塩、酢酸塩等の緩衝剤、クロロブタノール、塩化ベンザルコニウム等の保存剤、亜硫酸ナトリウム又はエデト酸二ナトリウム等の安定化剤、塩化ナトリウム、塩化カリウム及びグリセリン等の等張化剤、又はポリソルベート80、シクロデキストリン等の溶解補助剤、その他点眼剤の製造に通常使用される成分を加えることができる。

#### 【作用】

T-2、T-9: G.S. Bajwa et al., Journal of Medicinal Chemistry, 16: p 134 (1973) に準じて2, 5-ジメトキシアニリンより合成。  
T-3: T-2を常法により酸化して得た。  
T-4、T-5及びT-6: L. Baxter et al., J.C.S. Perkin 1: p. 2374 - 9 (1973) に準じて2, 5-ジメトキシアニリンより4, 5, 8-トリヒドロキシ-2-メトキシカルボニルキノリンを合成し、常法により酸化、加水分解又は加水分解後酸化することにより、それぞれ目的物を得た。  
T-7、T-8: H. Link et al., Helvetica Chimica Acta, 65: p 2645 (1982) に準じて合成して得た。  
T-10: 市販試薬(レザズリン: No. 19, 930-3・アルドリッチ社)  
T-11: T-1及びo-アミノフェノールより、特公昭36-1782号の記載に従って製した。

#### (実験方法)

牛血清アルブミン (No. A-8022: シグマ社) (

以下「BSA」と略記する。)及びpH7.3の50mMリン酸緩衝液及び表1に示す各被験物質及びアミノグアニジンを用いて下記の通りのサンプル溶液を無菌的に調製し、37℃で4週間保存し、非酵素的グリコシル化の進行に伴って生成するフロシンをSchleicher等の方法[E. Schleicher et al., J. Clin. Biochem., 19: p 81-87 (1981)]に準じて高速液体クロマトグラフィーにより定量した。すなわち、反応後のサンプルを透析後、各1mlを凍結乾燥し、6N塩酸1mlを加えて100℃で20時間加水分解を行い、塩酸を留去した後、水1mlを加えて0.45μmのフィルターにて濾過し、高速液体クロマトグラフィー用の試料とした。カラムにはODS-120T(東ソー)を、溶離液には7mMのリン酸溶液を用い、検出波長280nm及び254nmにての吸収ピークの比が3.9:1であるピークをフロシンのピークとした。

(リン酸緩衝液中の組成)

(正常群): BSA 20mg/ml

(対照群): BSA 20mg/ml + ブドウ糖  
50mM

(被験群): BSA 20mg/ml + ブドウ糖  
50mM + 被験物質 5mM

各群のサンプルのフロシン定量結果より、次の式を用いて各被験物質のフロシン生成阻害率を算出した。

$$\text{阻害率(\%)} = (c - d) + (c - n) \times 100$$

但し、c: 対照群のフロシンのピーク面積

d: 被験群のフロシンのピーク面積

n: 正常群のフロシンのピーク面積

(結果)

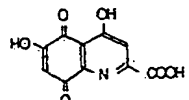
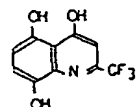
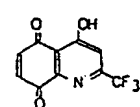
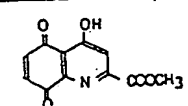
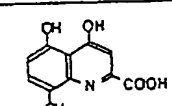
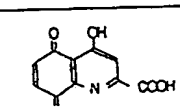
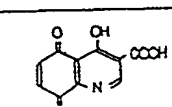
次の表1に示すとおり、T-1~T-11の各被験物質において、メイラード反応の公知の阻害剤たるアミノグアニジンに較べて、それぞれ著しく強い阻害効果が認められた。

表1

被験物質	阻害率(%)
T-1	77.8
T-2	79.9
T-3	73.4
T-4	92.5
T-5	78.9
T-6	75.0
T-7	79.9
T-8	96.9
T-9	99.5
T-10	73.8
T-11	96.6
アミノグアニジン	7.5

#### 【実施例】

本発明のメイラード反応阻害剤の製剤実施例を示す。但し、成分記載における略号は上記表1に記載の各化合物を示す。

T-1		77.8
T-2		79.9
T-3		73.4
T-4		92.5
T-5		78.9
T-6		75.0
T-7		79.9

## (実施例 1) 内服錠

下記成分を 1 錠分として常法により製造する。  
必要に応じ糖衣を施す。

T-1	100 mg
乳糖	80 mg
コーンスターチ	17 mg
ステアリン酸マグネシウム	3 mg

## (実施例 2) 内服錠

下記成分を 1 錠分として常法により製造する。  
必要に応じ糖衣を施す。

T-2	50 mg
コーンスターチ	90 mg
乳糖	30 mg
トクロキフ・α・トクロール	25 mg
ステアリン酸マグネシウム	5 mg

## (実施例 3) カプセル剤

下記成分を常法に従って混和し、顆粒状としたものをカプセルに各 1 個 100 mg 充填する。

T-5	10 mg
コーンスターチ	45 mg

ポリソルベート 80	0.2 g
亜硫酸ナトリウム	0.2 g
滅菌精製水	全 100 ml

## (実施例 6) 眼軟膏剤

下記成分を常法により混和して眼軟膏剤を製する。

T-11	0.5 g
白色ワセリン	100 g

乳糖	20 mg
結晶セルロース	24 mg
タルク	0.5 mg
ステアリン酸マグネシウム	0.5 mg

## (実施例 4) 注射剤

下記成分を常法により混合して溶液とし、濾過した後バイアルに充填しオートクレーブにて滅菌して製する。

T-7	20 mg
クロロブタノール	5 mg
注射用水	全 1 ml

## (実施例 5) 点眼剤

下記の成分を常法により混合して溶液とし、濾過滅菌して製する。

T-10	0.5 g
ほう酸	1.0 g
ほう砂	適量 (pH7.0)
塩化ナトリウム	0.25 g
エデト酸二ナトリウム	0.02 g
クロロブタノール	0.2 g

特許出願人 千寿製薬株式会社